

The invention relates to process for preparing 5'-inosinic acid (IMP) from a carbon source, hypoxanthine (Hyp), and a phosphoric acid donating material using a microorganism as an enzyme source. In this process, use is made of both a microorganism having the activity of yielding 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphoric acid (PRPP) or its precursor from a carbon source and another microorganism having the activity of yielding IMP from both of Hyp or its precursor and PRPP or its precursor.

(57) 要約

本発明は、微生物を酵素源として、炭素源、ヒポキサンチン(Hyp)およびリン酸基供与体とから5'-イノシン酸(IMP)を製造する方法に関する。

本発明においては、微生物として、炭素源から5-フォスホリボシル-1-ピロリン酸(PRPP)またはその前駆物質を生成する活性を有する微生物と、Hypまたはその前駆物質とPRPPまたはその前駆物質とからIMPを生成する活性を有する微生物とを併用する。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

|    |           |    |             |    |        |
|----|-----------|----|-------------|----|--------|
| AT | オーストリア    | ES | スペイン        | MG | マダガスカル |
| AU | オーストラリア   | FI | フィンランド      | ML | マリ     |
| BB | バルバドス     | FR | フランス        | MR | モーリタニア |
| BE | ベルギー      | GA | ガボン         | MW | マラウイ   |
| BF | ブルキナ・ファソ  | GB | イギリス        | NL | オランダ   |
| BG | ブルガリア     | HU | ハンガリー       | NO | ノルウェー  |
| BJ | ベナン       | IT | イタリア        | RO | ルーマニア  |
| BR | ブラジル      | JP | 日本          | SD | スーダン   |
| CA | カナダ       | KP | 朝鮮民主主義人民共和国 | SE | スウェーデン |
| CF | 中央アフリカ共和国 | KR | 大韓民国        | SN | セネガル   |
| CG | コンゴ       | LI | リヒテンシュタイン   | SU | ソビエト連邦 |
| CH | スイス       | LK | スリランカ       | TD | チャード   |
| CM | カメルーン     | LU | ルクセンブルグ     | TG | トーゴ    |
| DE | 西ドイツ      | MC | モナコ         | US | 米国     |
| DK | デンマーク     |    |             |    |        |

## 1

## 明 細 書

## 5'-イノシン酸の製造法

技術分野

本発明は5'-イノシン酸（以下「IMP」と略記する）の製造方法に関する。IMPは呈味性を有し、調味料として広く用いられている。

背景技術

IMPの製造法としては、(1)酵母菌体から抽出したリボ核酸を酵素的に分解して得られる5'-アデニル酸を脱アミノ化して製造する方法〔「核酸発酵」、アミノ酸・核酸集談会編 p.59 (1976)〕、(2)発酵法によって生産されるイノシンを化学的にリン酸化する方法〔「核酸発酵」、アミノ酸・核酸集談会編 p.209 (1976)〕、(3)ブレビバクテリウム属またはコリネバクテリウム属の細菌の変異株を用いて直接発酵生産する方法(特公昭50-26640)などが知られている。

IMPは、ヒポキサンチン（以下「Hyp」と略記する）と5-フオスフォリボシル-1-ピロリン酸（以下「PRPP」と略記する）とからサルベージ合成系を利用して生合成されることが知られている。この反応には、ヒポキサンチン・フオスフォリボシルトランスフェラーゼ（EC 2.4.2.8）が関与しており、該酵素活性を有する微生物の培養液中にHypを存在させることにより、培養液中にIMPが生成することが知られている〔「核酸発酵」、アミノ酸・核酸集談会編 p.35(1976)〕。

従来、HypとPRPPとからIMPが生成されることは知られているが、その生成量は少なく、IMPを工業的に安価に製造できる方法ではなかった。これはHypからIMPを生成する反応に必要な基質であるPRPPの供給が不十分であるためと考えられる。しかし、PRPPは高価で不安定な試薬であるため、PRPPを基質として添加するのは、経済的に有利でない。従って、より効率よくIMPを工業的に安価に製造する方法の開発が求められている。

### 発明の開示

本発明者は、IMPを工業的に安価に製造する方法を開発するために種々検討した。その結果、HypとPRPPとからIMPを生成させる反応において、炭素源からPRPPまたはその前駆物質を生成する活性を有する微生物と、HypとPRPPとからIMPを生成する活性を有する微生物とを併用することにより、Hypと炭素源とから効率よくIMPを製造できることを見出し、本発明を完成するに至った。

本発明は、PRPPまたはその前駆物質を生成する活性を有する微生物およびHypまたはその前駆物質とPRPPまたはその前駆物質とからIMPを生成する活性を有する微生物（以下転換菌と称することもある）またはそれらの培養液もしくは菌体の処理物、Hypもしくはその前駆物質またはそれらの含有物、炭素源およびリン酸基供与体の存在下、IMP生成反応を行わせてIMPを反応液中に生成蓄積させ、該反応液からIMPを採取することを特徴とするIMPの製造法を提供する。

さらに、本発明はHypのフォスフォリボシル化活性を有する酵素をコードする遺伝子を含むDNA断片とベクターDNAとの組換え体DNAおよび該組換え体DNAを保有する微生物を提供する。該微生物を転換菌として用いることにより、さらに収率よくHypとPRPPとからIMPを製造することができる。

以下に、本発明を詳細に説明する。

PRPPまたはその前駆物質を生成する活性を有する微生物（以下PRPP生成活性保持菌と称することもある）としては、該活性を有する微生物であればいずれでも使用できる。具体的には、  
ブレビバクテリウム・アンモニアゲネスATCC 6871

同 ATCC 6872

同 ATCC21062

|                  |           |
|------------------|-----------|
| 同                | ATCC21295 |
| 同                | ATCC21477 |
| 同                | ATCC21478 |
| 同                | ATCC21479 |
| 同                | ATCC21480 |
| アースロバクター・シトレウス   | ATCC11624 |
| コリネバクテリウム・グルタミクム | ATCC13032 |
| バチルス・サチルス        | ATCC14618 |
| エシェリヒア・コリ        | ATCC33525 |
| エシェリヒア・コリ        | ATCC11303 |
| スタフィロコッカス・オーレウス  | ATCC 4012 |
| サッカロミセス・サケ       | ATCC20018 |
| キャンディダ・ゼイラノイデス   | ATCC20356 |
| トルロプシス・サイクロフィラ   | ATCC22163 |

などを例示することができる。

これらの菌株を通常の培養方法に従って培養することにより、P R P P またはその前駆物質を生成する活性を有する微生物の培養液または菌体を得ることができる。すなわち、これらの菌株を適当な炭素源、窒素源、無機物、アミノ酸、ビタミンなどを含有する通常の培地で、好氣的条件下にて温度、p Hなどを調節しつつ培養を行えばよい。

培養は、振盪培養あるいは通気攪拌培養などの好氣的条件下で、温度は20～40℃、好ましくは25～35℃において、p Hは中性付近に維持しつつ、通常10～120時間行う。

H y p とP R P P またはその前駆物質とからI M Pを生成する活性を有する微生物（転換菌）としては、該活性を有する微生物であればいずれでも使用できる。具体的には、

|           |           |
|-----------|-----------|
| エシェリヒア・コリ | ATCC10798 |
| エシェリヒア・コリ | ATCC11303 |

|                    |              |
|--------------------|--------------|
| バチルス・サチルス          | ATCC14617    |
| フラボバクテリウム・デボランス    | ATCC10829    |
| セラチア・マルセッセンス       | FERM BP-1291 |
| サルモネラ・ティフィムリウム     | ATCC19585    |
| ラクトバチルス・カゼイ        | ATCC 7469    |
| ブレビバクテリウム・アンモニアゲネス | ATCC 6872    |
| コリネバクテリウム・グルタミカム   | ATCC13032    |

などを例示することができる。また、これら微生物との細胞融合などの分子育種手法によって、Hypのフォスホリボシル化活性を付与した菌株なども好適である。

上記微生物より、Hypのフォスホリボシル化活性を有する酵素をコードする遺伝子を含むDNA断片を取得し、該DNA断片をベクターDNAに組み込むことにより組換え体DNAを造成し、該組換え体DNAを保有させることよりHypとPRPPまたはその前駆物質とからIMPを生成する活性を強化した微生物を用いることにより、さらに効率よくIMPを生成させることができる。

Hypのフォスホリボシル化活性を有する酵素をコードする遺伝子としては、当該活性を有する酵素の遺伝子であればいずれでも用いられるが、例えばヒポキサンチン・フォスホリボシルトランスフェラーゼ（EC2.4.2.8、以下HPRTaseと称することもある）、グアニン・キサンチン・フォスホリボシルトランスフェラーゼ（EC2.4.2.22、以下GPRTaseと称することもある）などの遺伝子が好適である。これらHPRTaseまたはGPRTaseをコードしている遺伝子の供与体としては、上述したHypとPRPPとからIMPを生成する活性を有する微生物であればいずれでも用いることができる。具体的には、セラチア・マルセッセンス由来のHPRTase（実施例1）またはGPRTase（実施例2）をコードする遺伝子、およびエシェリヒア・コリ由来のGPRTase（実施例3）をコードする遺伝

子をあげることができる。これらの遺伝子を含むDNA断片をプラスミド・ベクターに挿入し、得られた組換え体DNAを用いて形質転換することにより、H P R T a s e およびG P R T a s e を強化した菌株を得ることができる。

これらの微生物を通常の培養方法によって培養することによって、H y p およびP R P P とからI M P を生成する活性を有する培養液、菌体またはそれらの処理物を得ることができる。すなわち、これらの微生物を適当な炭素源、窒素源、無機物、アミノ酸、ビタミンなどを含有する通常の培地中において、好氣的条件下で温度、p Hなどを調節しつつ培養を行えばよい。

培養は、振盪培養あるいは通気攪拌培養などの好氣的条件下で行う。培養温度は20～50℃がよく、28～40℃がより好ましい。培養中の培地のp Hは中性付近に維持することが望ましい。培養時間は通常1～48時間である。

P R P P 生成活性保持菌株、およびH y p とP R P P とからI M P を生成する活性を有する菌株の培養に用いる炭素源としては、グルコース、フラクトース、シュークロース、マルトース、マンニトール、ソルビトールなどの炭水化物や糖アルコール、グリセロール、さらにピルビン酸、乳酸、クエン酸などの各種のアルコールや有機酸、グルタミン酸、メチオニン、リジンなどの各種アミノ酸などが使用できる。また、澱粉加水分解物、糖蜜、廃糖蜜、白糖、キャッサバ、バガス、コーン・スティーブ・リカーなどの天然有機栄養源など、用いる菌株が資化しうるものであればいずれでも用いることができる。

窒素源としては、アンモニアあるいは塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、酢酸アンモニウムなどの各種無機および有機アンモニウム塩類、グルタミン酸、グルタミン、メチオニンなどのアミノ酸、あるいはペプトン、N Z アミン、コーン・スティーブ・リカー、肉エキス、酵母エキス、カゼイン加水分解物、フィッシュ

ミールあるいはその消化物などの含窒素有機物など種々の物が使用可能である。

さらに、無機物としては、リン酸二水素カリウム、リン酸一水素ナトリウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、塩化カルシウム、塩化鉄、硫酸銅、塩化マンガン、モリブデン酸アンモン、硫酸亜鉛などを必要に応じて添加する。微生物の生育に必要なビタミン、アミノ酸、ミネラル、核酸その他のものは必要に応じて添加する。

このようにして得られるHypもしくはその前駆物質またはそれらを含む物質、PRPP生成活性保持菌培養液もしくはその菌体またはそれらの処理物を含む液、および転換菌培養液もしくはその菌体またはそれらの処理物を含む液を用いて、これらと炭素源、リン酸基供与体、その他の必要な成分とを接触させることによってIMPを得ることができる。なお、必要に応じてPRPP前駆物質を添加してもよい。

PRPPもしくはその前駆物質の生成活性保持菌の培養液、菌体もしくはそれらの処理物と、PRPPとHypとからIMPを生成する活性を有する転換菌の培養液、菌体もしくはそれらの処理物と、Hypもしくはその前駆物質および炭素源やリン酸基供与体などとを接触させるには、それぞれを別個に培養し培養終了後混合してもよいし、また、PRPP生成活性保持菌の培養開始時点から培養終了時点までのいずれかの時点において、Hypもしくはその前駆物質および転換菌の培養液、菌体もしくはそれらの処理物を混合してもよい。さらに、転換菌の培養開始時点から培養終了時点までのいずれかの時点で、Hypもしくはその前駆物質およびPRPP生成活性保持菌の培養液、菌体もしくはそれらの処理物を添加してもよい。また、PRPP生成活性保持菌および転換菌を混合培養し、Hypもしくはその前駆物質を任意の時期に添加してもよい。

Hypの前駆物質としては、例えばイノシンがあげられるが、その



他微生物的もしくは酵素的に同様に容易にHypに変換され得るものであり、かつPRPP生成活性保持菌、転換菌のいずれかの菌株もしくはそれらの菌株が保持する活性によりHypに変換される物であれば、いずれでも用いることができる。また、前駆物質を酵素処理などの前処理によりHypに変換して用いることも、また酵素添加などにより転換反応と並行してHypへの変換を行わせつつ用いることもできる。さらに、イノシンの精製品、粗精製品、イノシン発酵液、除菌体上清液およびその濃縮物など、HypからIMPへのフォスフォリボシル化反応を妨げないものであればいずれでも用いることができる。

PRPP生成基質としては、炭素源とリン酸基供与体が用いられる。炭素源としては、使用するPRPP生成活性保持菌により利用され得るものであれば、グルコース、リボース、アラビノース、ラクトース、マルトース、シュクロース、マンニトール、ソルビトール、トレハロース、糖蜜、廃糖蜜、その他の糖質、澱粉加水分解物などの炭水化物、ピルビン酸、乳酸、酢酸、 $\alpha$ -ケトグルタル酸などの有機酸、グリシン、アラニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、グルタミンなどのアミノ酸などいずれでもよい。また、アセチルリン酸、カルバミルリン酸、クレアチンリン酸などのリン酸化化合物も用いることができる。

リン酸基供与体としては、オルソリン酸、ピロリン酸、ポリリン酸、ポリメタリン酸などの無機リン酸のナトリウム塩、カリウム塩、マグネシウム塩などいずれでも使用できる。また、アセチルリン酸、カルバミルリン酸、クレアチンリン酸、フラクトース-1、6-二リン酸などの有機リン酸化化合物も用いることができる。その濃度は、10～400 mMの範囲を保つことが望ましい。

PRPP前駆物質としては、PRPPもしくはその前駆物質生産菌が生産し得る物であり、かつ転換菌により容易にPRPPに変換され得る物であればいずれでもよいが、例えば5'-アデノシン-3リン酸

(以下A T Pと称することもある)、5'-アデノシン-2リン酸、5'-アデノシン-1リン酸、アデノシン、アデニンなどA T P関連物質や、リボース、リボース-5-リン酸、リボース-1-リン酸その他の五炭糖もしくはそのリン酸化物など、P R P Pの生成を促進し、H y pとP R P PとからI M Pへのフォスホリボシル化反応を阻害しないものであればいずれでも使用できる。なお、炭素源から生合成されるP R P Pの量が十分であれば、特に添加する必要はない。

転換菌として、H y pのフォスホリボシル化活性を有する酵素をコードする遺伝子を含むD N A断片とベクターD N Aとの組換え体D N Aを保有する微生物を用いる場合、P R P Pの供給源は特に限定されず、P R P P生成活性保持菌を用いずに試薬として添加してもよい。しかし、P R P P生成活性保持菌を用いることにより、さらに収率よくI M Pを生成させることができる。

H y pもしくはその前駆物質からI M Pへのフォスホリボシル化反応は、上記混合液に必要な応じてマグネシウムイオン、界面活性剤および／または有機溶剤などを加え、p Hを6～10、より好ましくは7～8に調節しつつ、かつ20～50℃に1～48時間保ちつつ行う。H y pからI M Pへのフォスホリボシル化反応時のH y pの濃度は、1～100 mg/mlの範囲にあることが望ましい。

P R P P生成活性保持菌および転換菌の各培養液または菌体の処理物としては、培養液の濃縮物および乾燥物、培養物を遠心分離して得られる菌体、凍結菌体、さらには菌体の乾燥物、凍結乾燥物、アセトン処理物、界面活性剤および／または有機溶剤処理物、溶菌酵素処理物、固定化菌体などがあげられる。また、該菌体から抽出したP R P P生合成酵素またはフォスホリボシル化酵素含有液、それらの酵素の精製標品、固定化物なども用いることができる。

界面活性剤としては、ポリオキシエチレン・ステアシルアミン、(例えばナイミンS-215、日本油脂社製；以下特記しない限り同社

製のものを使用)、セチルトリメチルアンモニウム・ブロマイド、カチオンF B、カチオンF 2 - 4 0 Eなどのカチオン性界面活性剤、ナトリウムオレイルアミド硫酸、ニューレックスT A B、ラピゾール80などのアニオン系界面活性剤、ポリオキシエチレンソルビタン・モノステアレート(例えばノニオンS T 2 2 1)などの両性界面活性剤、その他三級アミンP B、ヘキサデシルジメチルアミンなど、P R P Pの生合成および/またはH y pとP R P PとからI M Pへのフォスフォリボシル化反応を促進する物であればいずれでも使用できる。これらは通常0.1 ~ 5 0 mg/ml、好ましくは1 ~ 2 0 mg/mlの濃度にて用いられる。

有機溶剤としては、トルエン、キシレン、脂肪族アルコール、ベンゼン、酢酸エチルなどが用いられ、その濃度は0.1 ~ 5 0  $\mu$ l/ml、好ましくは1 ~ 2 0  $\mu$ l/mlがよい。

P R P Pの生合成反応およびH y pとP R P PとからI M Pへのフォスフォリボシル化反応を行う際のマグネシウムイオンの濃度は、4 ~ 4 0 0 mMの範囲を保つことが望ましい。培養液または菌体などから該反応系に持ち込まれるマグネシウムイオンの量が、この濃度範囲を満たす場合は添加の必要はなく、一方、不足する場合は上記の濃度範囲に入るようにマグネシウムイオンを添加する。また過剰の場合は希釈する。マグネシウムイオンとしては無機塩でも、有機酸の塩でも使用できる。反応終了後、反応液中に生成蓄積したI M Pを採取するには、イオン交換樹脂などを用いる通常の方法を用いて行う。

#### 図面の簡単な説明

第1図は、プラスミドp A I 6 3の制限酵素切断地図を表す。図中、EはE c o R I、S mはS m a I、S cはS c a I、B gはB g l II、KはK p n I、X hはX h o I、MはM l u I、HはH i n d IIIをそれぞれ表す。

以下に、本発明の実施例を示す。

実施例1. セラチア・マルセッセンス由来のH P R T a s e遺伝子を

含むDNA断片を含む組換え体プラスミドの取得

(1) H P R T a s e 遺伝子のクローン化のための受容菌の造成

H P R T a s e 遺伝子（以下 h p t 遺伝子と称することもある）を取得するために用いる受容菌として、HPRTase およびGPRTase を欠損し、かつイノシンおよび／またはHyp要求性を示す菌株エシェリヒア・コリSφ609株〔B. Jochimsen, P. Nygaard, and T. Vestergaard: *モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティクス* (Mol. Gen. Genet.), 143, 85(1975)、Yale大学E. coli Genetic Stock Center から入手〕をN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン（以下NTGと略記する）により突然変異処理を行い、宿主制限系の解除されたA I 6 7 5 株を造成した。

NTGによる変異処理は、以下のようにして行った。すなわち、LB培地10mlを含む大型試験管を用い37℃にて一夜往復振盪培養（190rpm）して得た培養液を、3000rpmにて15分間遠心分離して菌体を集めた。沈澱した菌体を生理食塩水（0.9%食塩水溶液）にて2回洗浄後、生理食塩水に1ml当り $5 \times 10^8$ の菌数となるように懸濁した。この懸濁液にNTGを最終濃度が500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように添加し、45分間室温に放置した。生理食塩水にて2回洗浄し、NTG処理菌体を得た。

宿主制限系の有無の検定は、突然変異処理を施した菌をバクトトリプトン（ディフコ社製）10g/l、酵母エキス（ディフコ社製）5g/l、食塩5g/lの組成で、pH7.2に調整したLB液体培地で30℃、20時間培養後、エシェリヒア・コリC600 ( $r^{-m^{-}}$ ) 株（ATCC 33525）より公知の方法〔J. H. Miller, *エックスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティクス* (Experiments in Molecular Genetics), Cold Spring Harbor Lab. (1972)]により調整した $\lambda$ ファージとLB平板培地（LB液体培地にディフコ社製寒天1.5%添加）上でクロスストリークを行い、 $\lambda$ ファージの菌への感受性を指標として行った。な

1 1

お、A1675 の遺伝子型は *ara*, *rpsL*, *deoD*, *hsdR*, *purH/J*,  $\Delta$ *pro-gpt-lac*, *thi*, *hpt* である。

(2) *hpt* 遺伝子のショットガンクローニング

セラチア・マルセッセンス Y T 1 0 1 (FERM BP-1291) を L B 培地に植菌し、30℃で20時間培養した。得られた培養菌体から公知の方法 [H. Sato & K. I. Miura: バイオキミカ・エ・バイオフィジカ・アクタ (Biochim. Biophys. Acta), 72, 619 (1963)] に従い染色体 DNA を分離精製した。ベクターは、エシェリヒア・コリ J M 1 0 9 株 [Y. Yanish-Perron et al.: ジーン (Gene), 33, 103 (1985)] から公知の方法 [T. Maniatis et al.: モレキュラー・クローニング (Molecular cloning), Cold Spring Harbor Lab. (1982)] により分離精製した p U C 1 9 を用いた。なお、p U C 1 9 を保有する J M 1 0 9 株を以下 A I 6 2 3 株と呼ぶ。また、以下特記しない限り菌の培養および保存には L B 培地を用いた。

精製したセラチア・マルセッセンス Y T 1 0 1 株の染色体 DNA 5  $\mu$ g を、100 mM トリス・塩酸緩衝液 (pH 7.5)、50 mM NaCl、6 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM ジチオスレイトール、100  $\mu$ g/ml 牛血清アルブミンの組成の緩衝液 (以下「EcoRI 緩衝液」と称する) 4.0  $\mu$ l に溶かし、20 単位の制限酵素 EcoRI (宝酒造社製、以下特記しない限り制限酵素はすべて宝酒造社製を使用) を加え、37℃で2時間消化反応を行ったのち、65℃で10分間の熱処理により反応を停止させた。

この消化物に蒸留水 140  $\mu$ l、3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.6) 20  $\mu$ l を添加後、2 倍量の氷冷エタノールを加え、-80℃にて20分間静置した。遠心分離後上清を捨て、DNA の沈澱を取得した (以下この方法を「エタノール沈澱法」と呼ぶ)。この沈澱に20  $\mu$ l の蒸留水を加えて沈澱を溶解して、染色体 DNA 断片の濃縮液を得た。

一方、p U C 1 9 プラスミド DNA 2  $\mu$ g を EcoRI 緩衝液 40  $\mu$ l

## 1 2

に溶かし、10単位のEcoRIを加え、37℃で2時間消化反応を行ったのち、65℃、10分間の熱処理により反応を停止させた。上記と同様のエタノール沈澱法によりプラスミドDNA断片の濃縮を行い、15 $\mu$ lの蒸留水を加え沈澱を溶解した。

このようにして得たセラチア・マルセッセンスの染色体DNAのEcoRI消化断片とpUC19のEcoRI消化断片とを66mMトリス・塩酸緩衝液(pH7.6)、6.6mM MgCl<sub>2</sub>、10mMジチオスレイトールおよび1mM ATPの組成の緩衝液50 $\mu$ lに溶解して、2単位のT4DNAリガーゼ(宝酒造社製)を加えて12℃にて18時間処理した。得られた組換え体混合物を用い、上記(1)で造成したエシェリヒア・コリAI675株を公知の方法[T. Maniatis et al.: モレキュラー・クローニング(Molecular cloning), Cold Spring Harbor Lab. (1982)]により形質転換し、アンピシリン75 $\mu$ g/mlを含み、Hypまたはイノシンを含まないLB平板培地上に生育する菌株を選択することにより、アンピシリン耐性で、かつHypまたはイノシン要求性が相補された形質転換株を得た。このようにして得られた菌株から、pUC19プラスミドDNAを調製したのと同様の方法によってプラスミドDNAを分離精製し、該DNAをEcoRIで消化することによりプラスミドの構造解析を行った結果、pUC19のEcoRI切断部位に約15キロベース(以下kbと略記する)のセラチア・マルセッセンス由来のDNA断片が挿入された組換え体プラスミドであることを確認し、pAI63と名付けた。pAI63を用いてエシェリヒア・コリAI675株を形質転換し、得られた形質転換株の平板上での生育を調べたところ、M9Ap平板培地(NH<sub>4</sub>Cl 1g、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 14.7g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3g、NaCl 5g、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.25g、CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 15mg、グルコース 2g、ビタミンB<sub>1</sub> 1mg、アルギニン 0.1g、プロリン 0.1g、アンピシリン 75mgを水1lに溶解し、寒天1.5%を加えたもの)に各々1mMのHyp、イノ

## 1 3

シン、グアニシンまたはグアノシンを含む平板上で生育し、1 mM キサンチンを含む M9 Ap 平板上では生育しなかった。この結果は、p A I 6 3 保有株はキサンチンを基質にしないことから、p A I 6 3 上にはセラチア・マルセッセンス由来の h p t 遺伝子が存在することを示唆している。得られた p A I 6 3 の構造を、種々の制限酵素消化とアガロースゲル電気泳動により解析した結果、第 1 図に示すような構造を有していることがわかった。

p A I 6 3 を用いて、エシェリヒア・コリ J M 1 0 9 株を形質転換することにより、p A I 6 3 を保有するエシェリヒア・コリ A I 6 9 0 を得た。本菌株は、昭和 62 年 11 月 2 日付で工業技術院微生物工業技術研究所（微工研）に FERM BP-1545 として寄託されている。

### (3) H P R T a s e 活性の測定

H P R T a s e 活性は以下の方法により測定した。

エシェリヒア・コリ A I 6 7 5、A I 6 2 3 および A I 6 9 0 の種培養を L B 液体培地にそれぞれ接種し、30℃にて 20 時間振盪培養したのち菌体を遠心分離した。適当量の 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に懸濁し、超音波処理を行い、破碎菌体を遠心分離により除去した後の上清画分を粗酵素液として活性測定に用いた。

粗酵素液を 100 mM トリス・塩酸緩衝液 (pH 7.0)、10 mM  $MgCl_2$ 、20 mM フッ化ソーダ、5 mM P R P P、2.5 mM H y p の組成の反応液中に共存させ、37℃にて静置することにより、H y p からの I M P 生成反応を行った。I M P の生成は、経時的に反応液を採取し、100℃、2 分間煮沸し遠心分離後上清画分を希釈したものを高速液体クロマトグラフィーを用い、254 nm の吸光度を測定することにより定量した。

活性は高速液体クロマトグラフ (TRIOTOR V 型、日本分光社製) を用いて、37℃で 1 分間に 1 nM の I M P を生成する活性を 1 単位として表した。結果を第 1 表に示す。

## 14

実施例2. セラチア・マルセッセンス由来のG P R T a s e 遺伝子を含むDNA断片を含む組換え体プラスミドの取得

(1) G P R T a s e 遺伝子のショットガンクローニング

G P R T a s e は、H P T a s e 活性を併せ有しているので、H P T a s e 遺伝子を取得したのと同様の方法でクローニングを行いH P T a s e 活性を示す形質転換を取得し、該形質転換株よりG P R T a s e 活性を示す菌株を選択することにより、G P R T a s e 遺伝子（以下g p t 遺伝子と称することもある）を含む組換え体プラスミド保有株を得ることができる。

実施例1と同様にセラチア・マルセッセンスY T 1 0 1 (FERM BP-1291)を培養し、得られた培養菌体から染色体DNAを分離精製した。またベクターとしては実施例1と同様にp U C 1 9を用いた。

精製したセラチア・マルセッセンスY T 1 0 1株の染色体DNA 5  $\mu$ gをE c o R I 緩衝液 4 0  $\mu$ lに溶かし、20単位の制限酵素H i n d IIIを加え、37℃で2時間消化反応を行ったのち、65℃で10分間の熱処理により反応を停止させた。

この消化物からエタノール沈澱法により沈澱を取得した。この沈澱に20  $\mu$ lの蒸留水を加えて沈澱を溶解して、染色体のDNA断片濃縮液を得た。

一方、p U C 1 9 プラスミドDNA 2  $\mu$ gをE c o R I 緩衝液 4 0  $\mu$ lに溶かし、10単位のH i n d IIIを加え、37℃で2時間消化反応を行ったのち、65℃、10分間の熱処理により反応を停止させた。エタノール沈澱法によりプラスミド断片の濃縮を行い、15  $\mu$ lの蒸留水を加え沈澱を溶解した。

このようにして得られたセラチア・マルセッセンスの染色体DNA断片とp U C 1 9 のH i n d III消化断片とを実施例1の(2)と同様に処理し、組換え体混成物を得た。得られた組換え体混成物を用い、エシエリヒア・コリA I 6 7 5株を実施例1と同様に形質転換し、アンピ



## 1 5

シリシン(75  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )に耐性で、かつHypまたはイノシン要求性が相補された形質転換株を選択した。このようにして得られた菌株から、pUC19のDNAを調製したのと同様の方法によってプラスミドを分離精製し、該DNAをHind IIIで消化することによりプラスミドの構造解析を行った結果、pUC19のHind III切断部位に約20 kbのセラチア・マルセッセンス由来のDNA断片が挿入された組換え体プラスミドであることを確認し、pAI64と名付けた。pAI64を用いてエシェリヒア・コリAI675株を形質転換し、得られた形質転換株の平板上での生育を調べたところ、M9Ap平板培地に各々1 mMのHyp、イノシン、グアニン、グアノシンを含む平板上および1 mMのキサンチンを含む平板上で生育した。この結果は、pAI64保有株はキサンチンを基質にすることからpAI64上にはセラチア・マルセッセンス由来のgpt遺伝子が存在することを示唆している。

pAI64を用いて、エシェリヒア・コリJM109株を形質転換することにより、pAI64を保有するエシェリヒア・コリAI712を得た。本菌株は、昭和62年11月2日付で、微工研にFERM BP-1546として寄託されている。

## (2) GPRTase活性の測定

GPRTase活性は以下の方法により測定した。

活性測定実験に供試するエシェリヒア・コリの培養および粗酵素液の調製は実施例1の(3)と同様に行った。

粗酵素液を100 mM トリス・塩酸緩衝液(pH 7.0)、10 mM  $\text{MgCl}_2$ 、20 mM フッ化ソーダ、5 mM PRPP、2.5 mM グアニンの組成の反応液中に共存させ、37℃にて静置することにより、グアニンからのGMP生成反応を行った。

GMPの生成は、経時的に反応液を採取し、100℃、2分間煮沸し遠心分離後上清画分を希釈したものを高速液体クロマトグラフを用

16

い、254 nmの吸光度を測定することにより定量した。活性は高速液体クロマトグラフ (TRIROTOR V型、日本分光社製) を用いて、37℃で1分間に1 nMのGMPを生成する活性を1単位として表した。

第1表にHPRaseおよびGPRTaseの活性を示す。

第1表 セラチア・マルセッセンスのHPRaseおよびGPRTase遺伝子のエシェリヒア・コリでの発現

| 宿主菌株<br>(エシェリヒア・コリ)  | HPRTase<br>比活性<br>(単位/μg蛋白) | GPRTase<br>比活性<br>(単位/μg蛋白) |
|----------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| AI675                | 0                           | 0                           |
| AI623 (JM 109/pUC19) | 0.034                       | 0.026                       |
| AI690 (JM 109/pAI63) | 1.130                       | 0.132                       |
| AI712 (JM 109/pAI64) | 0.096                       | 0.134                       |

実施例3. エシェリヒア・コリ由来のGPRTase遺伝子を効率よく発現するプラスミドの造成

(1) エシェリヒア・コリのGPRTase遺伝子 (gpt) のpUC19プラスミドへのサブクローニング

エシェリヒア・コリの染色体DNA由来のgpt遺伝子とColE1のハイブリッド・プラスミドであるpLC44-11を保有しているエシェリヒア・コリJA200株〔セル(Cell) 9, 91(1976)〕をLB培地に植菌し、30℃で18時間培養した。得られた培養菌体から、公知の方法〔T. Maniatis et al.: モレキュラー・クローニング (Molecular cloning), Cold Spring Harbor Lab. (1982)〕に従ってプラスミドpLC44-11を分離精製した。ベクターとして用いるpUC19も、同様の方法でエシェリヒア・コリJM109株から分離精製した。pLC44-11は約30kbの大きさで、約1kbのBglI-HincII断片上にgpt遺伝子が存在すると予想された〔R. C. Mulligan and

P. Berg : サイエンス (Science) 209, 1422 (1980) ]。

上記で調製した p L C 4 4 - 1 1 プラスミド DNA 5  $\mu$ g を 10 mM トリス・塩酸緩衝液 (pH 7.5)、50 mM NaCl、6 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM ジチオスレイトールおよび 100  $\mu$ g/ml 牛血清アルブミンの組成の緩衝液 50  $\mu$ l に溶かし、20 単位の制限酵素 Bgl I を加え、37℃にて1時間消化反応を行った。次に20単位の Hinc II を加え、37℃にて1時間消化反応を行ったのち、65℃10分間の熱処理により反応を停止させた。この消化物を低融点アガロースゲル電気泳動法 [アナリティカル・バイオケミストリィ (Analytical Biochemistry), 98, 305 (1979)] に従い、約 1 kb のプラスミド DNA 断片を精製した。

得られた DNA 断片を、40  $\mu$ l の 50 mM トリス・塩酸緩衝液 (pH 7.6)、7 mM MgCl<sub>2</sub>、6 mM 2-メルカプトエタノール、0.25 mM dATP、0.25 mM dGTP、0.25 mM dTTP、0.25 mM dCTP の組成の反応液に溶解し、続いて6単位のエシェリヒア・コリ DNA ポリメラーゼ I・Klenow 断片 (New England Biolabs. 社製、1  $\mu$ l) を加え、15℃にて2時間反応させ、Bgl I によって生じた 3'-突出末端を平滑末端に変えた。その後フェノール、クロロホルム抽出およびエタノール沈澱をし、DNA 断片を精製した。

一方、pUC 19 プラスミド DNA 2  $\mu$ g を 10 mM トリス・塩酸緩衝液 (pH 7.5)、6 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM ジチオスレイトールおよび 100  $\mu$ g/ml 牛血清アルブミンの組成の緩衝液 20  $\mu$ l に溶かし、5 単位の Sma I を加え、37℃で2時間消化反応を行い、2.7 kb のプラスミド DNA 断片を精製した。

このようにして得た約 0.2  $\mu$ g の p L C 4 4 - 1 1 由来の DNA 断片と、約 0.5  $\mu$ g の pUC 19 由来の Sma I 切断 DNA 断片とを 20 mM トリス・塩酸緩衝液 (pH 7.6)、10 mM MgCl<sub>2</sub>、10 mM

## 18

ジチオスレイトールおよび0.5 mM ATPの組成の緩衝液40  $\mu$ lに溶解し、2単位のT4 DNAリガーゼを加えて12℃、18時間処理した。得られた組換え体混成物を用い、エシェリヒア・コリAI675株を公知の方法により形質転換し、アンピシリン(75  $\mu$ g/ml)に耐性で、かつグアニン要求性が相補された形質転換株を選択した。このようにして得られた菌株から、pUC19のDNAを調製したのと同様の方法によってプラスミドを分離精製し、該DNAをEcoRI、HindIIIなどの制限酵素で消化することにより、プラスミドの構造解析を行った結果、pUC19に約1 kbのgpt遺伝子を含むDNA断片が挿入された組換え体プラスミドであることを確認し、pGPT1と名付けた。pGPT1を用いて、エシェリヒア・コリJM109株を形質転換することにより、pGPT1を保有するエシェリヒア・コリアI737を得た。本菌株は昭和62年11月2日付で、微工研にFERMBP-1547として寄託されている。

(2) エシェリヒア・コリのgpt遺伝子を強化したエシェリヒア・コリのHPRTaseおよびGPRTase活性の発現

実施例1および実施例2に記載した方法と同様にしてAI675、AI623およびAI737株のHPRTaseおよびGPRTase活性を測定した結果を第2表に示す。

第 2 表

| 宿主菌株<br>(エシェリヒア・コリ)  | HPRTase<br>比活性<br>(単位/<br>$\mu$ g 蛋白) | GPRTase<br>比活性<br>(単位/<br>$\mu$ g 蛋白) |
|----------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| AI675                | 0                                     | 0                                     |
| AI623 (JM 109/pUC19) | 0.039                                 | 0.026                                 |
| AI737 (JM 109/pGPT1) | 0.098                                 | 0.314                                 |

## 実施例4.

ブレヴィバクテリウム・アンモニアゲネスATCC 6872を、ポリペプ

トン、肉エキス、酵母エキス、食塩をそれぞれ1%、0.5%、0.5%、0.25%含む種培地（pH 7.2）10 mlを分注した70 ml容大型試験管に一白菌耳植菌し、30℃で24時間往復振盪培養した。得られた種培養2 mlを、グルコース1.5%、カゼイン加水分解物、0.01%、酵母エキス0.7%、硫安1.0%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.3%、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.3%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5%、ビオチン10  $\mu\text{g}/\ell$ の組成の培地をpH 7.2に調整後、300 ml容バッフル付三角フラスコに20 mlずつ分注し、120℃、20分間蒸煮殺菌した培地に植菌した。回転振盪培養にて30℃で培養中、必要に応じ尿素を添加することによって、pHを中性付近に保ちつつ76時間培養した。培養終了後、菌体を遠心分離により集め-20℃にて凍結保存した。

LB液体培地（pH 7.2）10 mlを分注・殺菌した大型試験管に、エシェリヒア・コリATCC 10798株を一白金耳接種し、30℃にて20時間往復振盪培養した。これを、LB液体培地400 mlを含む2  $\ell$ 容三角フラスコに10 ml植菌し、37℃にて17時間回転振盪培養したのち、菌体を遠心分離して集め、凍結保存（-20℃）した。

転換菌としてエシェリヒア・コリATCC 10798の凍結菌体を最終菌体濃度が湿菌体重量にて50 mg/mlとなるように、またPRPP生成活性保持菌としてブレヴィバクテリウム・アンモニアゲネスATCC 6872の凍結菌体を同じく最終菌体濃度が湿菌体重量にて200 mg/mlとなるように水に懸濁した。この混合菌体溶液に、Hyp（興人社製）100 mM、グルコース80 mg/ml、フィチン酸ソーダ（pH 7.0）5 mg/ml、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  20 mg/ml、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  5 mg/mlをそれぞれ添加し、さらにナイミーンS-215 4 mg/mlおよびキシレン10  $\mu\text{l}/\text{ml}$ を添加し、200 ml容ビーカーに20 mlずつ分注した。これをマグネチック・スターラーにて900 rpmで攪拌し、カセイソーダでpHを7.4付近に調節しつつ、32℃に24時間保ち、HypからIMPへのフォスフォリボシル化反応を行った。その結果、4.02 mM

## 20

のIMP（以下IMP・Na<sub>2</sub>・7H<sub>2</sub>O相当量として表示）が生成蓄積した。なお、ナイミーンS-215およびキシレンを添加しなかった場合は0.4 mMであった。また、プレビバクテリウム・アンモニアゲネスATCC 6872の菌体を無添加の場合、IMPの蓄積量は0.3 mM以下であった。

## 実施例5.

実施例1で得られたpAI 63を保有するエシェリヒア・コリAI 690株を、実施例4のエシェリヒア・コリATCC 10798を培養したのと同様の条件下で培養し、遠心分離後菌体を-20℃にて凍結保存した。得られた凍結菌体を、エシェリヒア・コリATCC 10798の代わりに用いた他は実施例4と同様にHypからIMPへのフォスフォリボシル化反応を行ったところ、反応液中に18.7 mMのIMPが生成蓄積した。

## 実施例6.

実施例2で得られたpAI 64を保有するエシェリヒア・コリAI 712株を、実施例4のエシェリヒア・コリATCC 10798を培養したのと同様の条件下で培養し、遠心分離後菌体を-20℃にて凍結保存した。得られた凍結菌体を、エシェリヒア・コリATCC 10798の代わりに用いた他は実施例4と同様にHypからIMPへのフォスフォリボシル化反応を行ったところ、反応液中に7.3 mMのIMPが生成蓄積した。

## 実施例7.

実施例3で得られたpGPT1を保有するエシェリヒア・コリAI 737株を、実施例4のエシェリヒア・コリATCC 10798を培養したのと同様に培養し、遠心分離後菌体を-20℃にて凍結保存した。得られた凍結菌体を、エシェリヒア・コリATCC 10798の代わりに用いて、実施例4と同様にHypからIMPへのフォスフォリボシル化反応を行ったところ、反応液中にIMPが6.9 mM生成蓄積し

た。

#### 実施例 8.

実施例 1 で得られた p A I 6 3 を保有するエシェリヒア・コリ A I 6 9 0 株を、実施例 4 のエシェリヒア・コリ A T C C 1 0 7 9 8 を培養したのと同様の条件下で培養し、遠心分離後菌体を  $-20^{\circ}\text{C}$  にて凍結保存した。また、ブレビバクテリウム・アンモニアゲネス A T C C 2 1 4 8 0 を、実施例 4 のブレビバクテリウム・アンモニアゲネス A T C C 6 8 7 2 を培養したのと同様の条件下で培養し、遠心分離後菌体を  $-20^{\circ}\text{C}$  にて凍結保存した。エシェリヒア・コリ A I 6 9 0 株の凍結菌体を、最終菌体濃度が湿菌体重量にて  $50\text{ mg/ml}$  となるように、またブレビバクテリウム・アンモニアゲネス A T C C 2 1 4 8 0 の凍結菌体を同じく、最終菌体濃度が湿菌体重量にて  $200\text{ mg/ml}$  となるように水に懸濁した。この混合菌体溶液に、H y p  $110\text{ mM}$ 、リボース  $15\text{ mg/ml}$ 、グルコース  $80\text{ mg/ml}$ 、フィチン酸ソーダ ( $\text{pH}7.0$ )  $5\text{ mg/ml}$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$   $20\text{ mg/ml}$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   $5\text{ mg/ml}$  をそれぞれ添加し、さらにナイミーン S - 2 1 5  $4\text{ mg/ml}$  およびキシレン  $10\text{ }\mu\text{l/ml}$  を添加し、 $200\text{ ml}$  容ビーカーに  $20\text{ ml}$  ずつ分注した。これをマグネチック・スターラーにて  $900\text{ rpm}$  で攪拌し、カセイソーダで  $\text{pH}$  を  $7.4$  付近に調節しつつ、 $32^{\circ}\text{C}$  に  $24$  時間保ち、H y p から I M P へのフォスフォリボシル化反応を行った。その結果反応液中に  $86\text{ mM}$  の I M P が生成蓄積した。

#### 実施例 9.

転換菌として、エシェリヒア・コリ A T C C 1 0 7 9 8 株の代わりに第 3 表に示す各菌株を用いた他は、実施例 8 と同様にして H y p から I M P へのフォスフォリボシル化反応を行った。結果を第 3 表に示す。

2 2

第 3 表

| 菌 株                |              | I M P 生成量<br>(mM) |
|--------------------|--------------|-------------------|
| エシェリヒア・コリ          | ATCC11303    | 5.57              |
| バチルス・サチルス          | ATCC14617    | 3.44              |
| フラボバクテリウム・デボランス    | ATCC10829    | 4.09              |
| セラチア・マルセッセンス       | FERM BP-1291 | 5.51              |
| サルモネラ・ティフィムリウム     | ATCC19585    | 3.80              |
| ラクトバチルス・カゼイ        | ATCC7469     | 3.57              |
| コリネバクテリウム・グルタミカム   | ATCC13032    | 4.47              |
| ブレビバクテリウム・アンモニアゲネス | ATCC6872     | 4.83              |

## 実施例 10.

P R P P 生成活性保持菌として、ブレビバクテリウム・アンモニアゲネス A T C C 6 8 7 2 株の代わりに第 4 表に示す各種菌株を用いる他は、実施例 4 と同様にして H y p から I M P へのフォスフォリボシル化反応を行い、第 4 表に示す結果を得た。

第 4 表

| 菌 株              |           | I M P 生成量<br>(mM) |
|------------------|-----------|-------------------|
| コリネバクテリウム・グルタミカム | ATCC13032 | 3.31              |
| バチルス・サチルス        | ATCC14618 | 3.22              |
| エシェリヒア・コリ        | ATCC33525 | 3.85              |
| スタフィロコッカス・オーレウス  | ATCC4012  | 2.46              |
| サッカロミセス・サケ       | ATCC20018 | 2.23              |
| キャンディダ・ゼイラノイデス   | ATCC20356 | 1.98              |
| トルロプシス・サイクロフィラ   | ATCC22163 | 2.37              |



## 23

## 特 許 請 求 の 範 囲

1. 5-フォスホリボシル-1-ピロリン酸またはその前駆物質を生成する活性を有する微生物およびヒポキサンチンまたはその前駆物質と5-フォスホリボシル-1-ピロリン酸またはその前駆物質とからイノシン酸を生成する活性を有する微生物またはそれらの培養液もしくは菌体の処理物、ヒポキサンチンもしくはその前駆物質またはそれらの含有物、炭素源およびリン酸基供与体の存在下、5'-イノシン酸生成反応を行わせて5'-イノシン酸を反応液中に生成蓄積させ、該反応液から5'-イノシン酸を採取することを特徴とする5'-イノシン酸の製造法。
2. ヒポキサンチンと5-フォスホリボシル-1-ピロリン酸またはその前駆物質とから5'-イノシン酸を生成する活性を有する微生物として、ヒポキサンチンのフォスホリボシル化活性を有する酵素をコードする遺伝子を含むDNA断片とベクターDNAとの組換え体DNAを保有する微生物を用いる請求項1記載の方法。
3. 該微生物が、エシェリヒア属に属し、ヒポキサンチンのフォスホリボシル化活性を有する酵素をコードする遺伝子を含むDNA断片とベクターDNAとの組換え体DNAを保有する微生物である請求項2記載の方法。
4. ヒポキサンチンのフォスホリボシル化活性を有する酵素をコードする遺伝子を含むDNA断片として、エシェリヒア・コリ、バチルス・サチルス、フラボバクテリウム・デボランス、セラチア・マルセッセンス、サルモネラ・ティフィムリウム、ラクトバチルス・カゼイ、ブレビバクテリウム・アンモニアゲネス、コリネバクテリウム・グルタミカムから選ばれる微生物の染色体DNA由来のDNA断片を用いる請求項2～3記載の方法。
5. ヒポキサンチンのフォスホリボシル化活性を有する酵素をコードする遺伝子がセラチア・マルセッセンス由来のヒポキサンチン・フ

## 24

オスフォリボシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子、またはエシェリヒア・コリもしくはセラチア・マルセッセンス由来のグアニン・キサンチン・フォスフォリボシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子である請求項2～4記載の方法。

6. 菌体の処理が、有機溶剤および／または界面活性剤を用い、これらを菌体とあらかじめ接触させるか、反応液中に存在させることにより行う請求項1～5記載の方法。

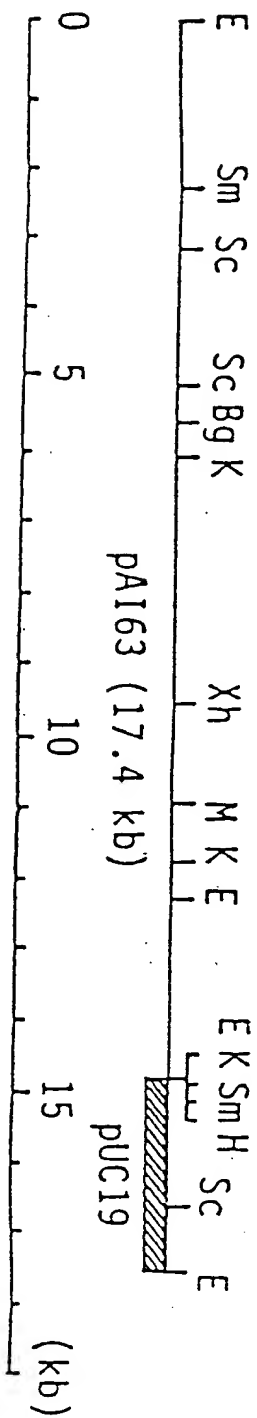
7. セラチア・マルセッセンス由来のヒポキサンチン・フォスフォリボシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片またはエシェリヒア・コリもしくはセラチア・マルセッセンス由来のグアニン・キサンチン・フォスフォリボシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片とベクターDNAとの組換え体DNA。

8. エシェリヒア属に属し、セラチア・マルセッセンス由来のヒポキサンチン・フォスフォリボシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片またはエシェリヒア・コリもしくはセラチア・マルセッセンス由来のグアニン・キサンチン・フォスフォリボシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片とベクターDNAとの組換え体DNAを保有する微生物。

9. 該微生物が、エシェリヒア・コリ AI 690 (FERM BP-1545), エシェリヒア・コリ AI 712 (FERM BP-1546) およびエシェリヒア・コリ AI 737 (FERM BP-1547) より選ばれる微生物である請求項8記載の微生物。

1/1

第 1 頁



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/JP89/01187

|   |  |                                     |
|---|--|-------------------------------------|
| <b>I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> (if several classification symbols apply, indicate all) <sup>6</sup>   |  |                                     |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC Int. CI <sup>5</sup><br>C12P19/32, C12N15/54, 15/70, 1/21// (C12P19/32, C12R1:19) (C12N15/54, C12R1:425) (C12N1/21, C12R1:19) (C12P19/32, C12R1:13, 1:19)   |  |                                     |
| <b>II. FIELDS SEARCHED</b>  |  |                                     |
| Minimum Documentation Searched <sup>7</sup>   |  |                                     |
| Classification System   | Classification Symbols   |                                     |
| IPC   | C12P19/32, C12N15/54, 15/70, 1/21  |                                     |
| Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched <sup>8</sup>  |  |                                     |
| Biological Abstracts Data Base (BIOSIS)<br>Chemical Abstracts Data Base (CA, REGISTRY)  |  |                                     |
| <b>III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <sup>9</sup></b>  |  |                                     |
| Category <sup>10</sup>  | Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>   | Relevant to Claim No. <sup>13</sup> |
| Y   | JP, B1, 48-39477 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.),<br>24 November 1973 (24. 11. 73),<br>& FR, A1, 1480009 & GB, A, 1139097                                    | 1, 6                                |
| Y   | JP, B1, 44-24309 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.),<br>15 October 1969 (15. 10. 69)  | 1, 6                                |
| Y   | JP, B1, 41-16560 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.),<br>19 September 1966 (19. 09. 66)  | 1, 6                                |
| Y   | JP, B1, 45-11556 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.),<br>25 April 1970 (25. 04. 70),<br>& FR, A1, 1473629 & US, A, 3674641<br>& GB, A, 1092597 & DE, A1, 1517820 | 1, 6                                |
| <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p><sup>10</sup> Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p> </div> </div> |  |                                     |
| <b>IV. CERTIFICATION</b>  |  |                                     |
| Date of the Actual Completion of the International Search   | Date of Mailing of this International Search Report  |                                     |
| February 14, 1990 (14. 02. 90)  | February 26, 1990 (26. 02. 90)   |                                     |
| International Searching Authority   | Signature of Authorized Officer  |                                     |
| Japanese Patent Office  |  |                                     |